



## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 03-219875

(43)Date of publication of application : 27.09.1991

(51)Int.Cl

C12N 15/12  
C07K 13/00  
C12N 1/19  
C12N 15/81  
C12P 21/02  
// (C12N 1/19  
C12R 1:865 )  
(C12N 15/81  
C12R 1:645  
C12R 1:19 )  
(C12P 21/02  
C12R 1:865 )

(21)Application number : 02-015559

(71)Applicant : CHEMO SERO THERAPEUT RES

INST

KOWA CO

(22)Date of filing : 25.01.1990

(72)Inventor : NAKAO JUNJI  
SUGAWARA KEISHIN  
MIYATSU YOSHINOBU  
HAMADA FUKUSABURO  
IWASAKI AKIO  
SUDA MAKOTO

## (54) PRODUCTION OF CPB-I AND RECOMBINANT PLASMID AND TRANSFORMED YEAST USING THEREFOR

## (57)Abstract:

PURPOSE: To provide the subject plasmid which is a shuttle vector having a gene originated from yeast and a gene originated from E.coli plasmid, containing a specific anticoagulant substance (CPB-1) manifestation gene fragment and capable of producing CPB-1 in high efficiency.

CONSTITUTION: The above recombinant plasmid is constructed of a shuttle vector having the above genes and has a CPB-1 manifestation gene fragment composed of Pho5 promoter, CPB-1-cDNA and GAP-DH terminator. The CPB-1-cDNA has been cloned by the present inventor and the details are disclosed in the specification of Japanese Patent Laid-Open Sho 64-20095. The CPB-1-cDNA is a gene fragment having a size of 1566bp and containing a gene fragment coding a peptide (CPB-1) consisting of 319 amino acids. It has been ascertained that the CPB-1 structure gene coded by the gene fragment codes the amino acid sequence of table 1.



## LEGAL STATUS

- [Date of request for examination]
- [Date of sending the examiner's decision of rejection]
- [Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]
- [Date of final disposal for application]
- [Patent number]
- [Date of registration]
- [Number of appeal against examiner's decision of rejection]
- [Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]
- [Date of extinction of right]

Copyright (C) 1998,2000 Japan Patent Office

## ⑫ 公開特許公報 (A) 平3-219875

⑬ Int.CI.<sup>5</sup>C 12 N 15/12  
C 07 K 13/00

識別記号

府内整理番号

⑭ 公開 平成3年(1991)9月27日

8619-4H

8717-4B

C 12 N 15/00

A※

審査請求 未請求 請求項の数 6 (全11頁)

⑮ 発明の名称 C P B - I の製造方法並びにこれに用いる組換えプラスミドおよび形質転換酵母

⑯ 特 願 平2-15559

⑰ 出 願 平2(1990)1月25日

⑱ 発 明 者 中 尾 順 二 熊本県熊本市清水町麻生田1795-4

⑲ 発 明 者 菅 原 敬 信 熊本県熊本市武蔵ヶ丘2-142

⑳ 発 明 者 宮 津 嘉 信 熊本県熊本市健軍2丁目12-23

㉑ 発 明 者 清 田 福 三 郎 熊本県菊池郡西合志町須屋2679-2

㉒ 出 願 人 財団法人化学生命及血清療法研究所 熊本県熊本市清水町大庭688番地

㉓ 出 願 人 興和株式会社 愛知県名古屋市中区錦3丁目6番29号

㉔ 代 理 人 弁理士 有賀 三幸 外2名

最終頁に続く

## 明細書

## 発明の名称

C P B - I の製造方法並びにこれに用いる組換えプラスミドおよび形質転換酵母

## 許諾の範囲

酵母由来の遺伝子と大腸菌プラスミド由来の遺伝子を有するシャトルベクターであって、さらに Pho 5 プロモーター、C P B - I - c DNA および G A P - D H T ターミネーターからなるC P B - I 発現遺伝子断片を有することを特徴とする組換えプラスミド。

酵母由来の遺伝子が、2 μ ori、arsI および形質転換後酵母用選択マーカー遺伝子を有するものである請求項(1)記載の組換えプラスミド。

大腸菌由来の遺伝子が、プラスミド pBR322 由来の origin および薬剤耐性遺伝子を有するものである請求項(1)記載の組換えプラスミド。

請求項(1)記載の組換えプラスミドを酵母に導入することにより得られる形質転換酵母。

宿主酵母が、Saccharomyces cerevisiae である

請求項(4)記載の形質転換酵母。

(6) 請求項(4)または(5)記載の形質転換酵母を培養し、該培養物より C P B - I を採取することを特徴とする C P B - I の製造方法。

## 3. 発明の詳細な説明

## 【産業上の利用分野】

本発明は、ヒト胎盤を始めとするヒト組織より得られる抗血液凝固物質（カルフォビンデン、以下 C P B - I と称する）の遺伝子組換えによる製造方法、ならびにこれに用いる組換えプラスミドおよび形質転換酵母に関する。

## 【従来の技術】

これまでに、生体関連の抗血液凝固物質として、ヘパリン、ヘパリシンコファクターⅡ、アンテトリシンⅢ、α 1-アンチトリプシン等が知られている。これまでのところ、抗血液凝固剤として実用化されたのはヘパリンのみであるが、副作用の問題や、使用方法が限定されていることから満足のいくものではなかった。

このような状況の下で、本出願人は、ヒト胎盤

から C P B - I (当初 P C I と称していた) を分離精製することに成功し、特許出願した (特開昭 62-174023号)。さらに、本出願人は、C P B - I に対して特異的なモノクローナル抗体を作製し、(特開昭 63-123395号)、その後にこの抗体をプローブとしてヒト胎盤 c D N A ライブライターから C P B - I をコードする遺伝子断片をクローニングし、これを遺伝子組換え技術により大腸菌で発現することに成功した (特開昭 64-20095号)。

このようにして大腸菌により発現・精製された C P B - I は、胎盤より精製された本来の C P B - I とほぼ同等の抗血液凝固活性を有することが確認された。しかしながら、この場合に発現の宿主となっている大腸菌は、弱熱物質 (バイロジエン) を特に多く産生することが知られており、目的の C P B - I の精製において、このようなバイロジエン等の除去操作が煩雑になることが危惧された。

また、一般に、特定の外来遺伝子を遺伝子組換え技術により発現させる場合は、発現の宿主細胞

このような状況において、本発明者は、C P B - I の遺伝子組換えによる製造に関して研究を重ねた結果、酵母を宿主としてしかも特定の発現系を用いることにより、所望する生理活性を有する C P B - I を極めて効率よくしかも安定に产生する形質転換酵母を得ることに成功し、C P B - I の効率的な製造方法を見いだして本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明の目的は抗血液凝固物質 C P B - I を遺伝子組換え技術を用いて製造する際ににおいて、C P B - I を極めて効率よく产生させるための酵母用組換えプラスミドおよび形質転換酵母ならびにこれを用いた C P B - I の製造方法を提供することにある。

#### [発明の構成および効果]

かかる目的を達成する本発明組換えプラスミドの構成は、酵母由来の遺伝子と大腸菌プラスミド由来の遺伝子を有するシャトルベクターであって、さらに Pho 5 プロモーター、C P B - I - c D N A および G A P - D H タミネーターか

として何を用いるか、発現用プロモーターとして何を用いるかによって、目的のペプチドの発現量は大きく変化することが知られている。これまでの様々な遺伝子組換えによる外来遺伝子の発現に関する報告により、一般的に効率のよい発現系というものが次第に明らかにされつつある。しかしながら、目的の外来遺伝子の発現産物が発現の宿主細胞に及ぼす影響等により、通常発現量が高いとされている発現系が、特定の外来遺伝子の発現には好ましい結果を示さないことがあることが判ってきた。これとは逆に、特定の外来遺伝子に対しては非常に相性がよく、極めて高い量の発現が可能となるような発現系が存在することも知られている。

したがって、C P B - I の工業的生産を目的として研究を進めるうえでは、より効率よくしかも安定に C P B - I を生産することが可能な C P B - I の生産に適した発現系を見いだすことが望まれていた。

#### [発明の目的]

らなる C P B - I 発現遺伝子断片を有することを特徴とするものである。

本発明において、遺伝子組換え技術により発現させる遺伝子： C P B - I - c D N A については本発明者らにより先にクローニングされており、詳細は、特開昭 64-20095号公報に記載されている。

この C P B - I - c D N A は、アミノ酸 319 個からなるペプチド (C P B - I ) をコードする遺伝子断片を含む 156 bp の遺伝子断片である。これにコードされる C P B - I 構造遺伝子は、下記のアミノ酸配列をコードしていることが確認されている。

Met Ala Gin Val Leu Arg Gly Thr Val Thr Asp  
Phe Pro Gly Phe Asp Glu Arg Ala Asp Ala Glu  
Thr Leu Arg Lys Ala Met Lys Gly Leu Gly Thr  
Asp Glu Glu Ser Ile Leu Thr Leu Leu Thr Ser  
Arg Ser Asn Ala Gin Arg Gin Glu Ile Ser Ala  
Ala Phe Lys Thr Leu Phe Gly Arg Asp Leu Leu  
Asp Asp Leu Lys Ser Glu Leu Thr Gly Lys Phe  
Glu Lys Leu Ile Val Ala Leu Met Lys Pro Ser

Arg Leu Tyr Asp Ala Tyr Glu Ile Lys His Ala  
 Leu Lys Gly Ala Gly Thy Asn Glu Lys Val Leu  
 Thr Glu Ile Ile Ala Ser Arg Thr Pro Glu Glu  
 Leu Arg Ala Ile Lys Glu Val Tyr Glu Glu Glu  
 Tyr Gly Ser Ser Leu Glu Asp Asp Val Val Gly  
 Ala Thr Ser Gly Tyr Tyr Glu Arg Met Leu Val  
 Ile Leu Leu Glu Ala Asn Arg Asp Pro Asp Ala  
 Gly Ile Asp Glu Ala Glu Val Glu Glu Asp Ala  
 Glu Ala Leu Phe Glu Ala Gly Glu Leu Lys Trp  
 Gly Thr Asp Glu Glu Lys Phe Ile Thr Ile Phe  
 Gly Thr Arg Ser Val Ser His Leu Arg Lys Val  
 Asp Lys Tyr Met Thr Ile Ser Gly Phe Glu  
 Glu Glu Thr Ile Asp Arg Glu Thr Ser Gly  
 Asn Leu Glu Glu Leu Leu Ala Val Val Lys  
 Ser Ile Arg Ser Ile Pro Ala Tyr Leu Ala Glu  
 Thr Leu Tyr Tyr Ala Met Lys Glu Ala Gly Thr  
 Asp Asp His Thr Leu Ile Arg Val Met Val Ser  
 Arg Ser Glu Ile Asp Leu Phe Asp Ile Arg Lys  
 Glu Phe Arg Lys Asn Phe Ala Thr Ser Leu Tyr  
 Ser Met Ile Lys Glu Asp Thr Ser Gly Asp Tyr

Lys Lys Ala Leu u Leu Leu Cys Gly Glu Asp  
 Asp

従って、本発明における C P B - I 発現プラスミドの構造には、上記のアミノ酸配列をコードする遺伝子断片が使用される。C P B - I をコードする遺伝子断片の具体的な塩基配列としては、その一例として下記の塩基配列からなる DNA を含む遺伝子断片が挙げられる。

ATG GCA CAG GTT CTC AGA GGC ACT GTG ACT GAC  
 TTC CCT GGA TTT GAT GAG CGG GCT GAT GCA GAA  
 ACT CTT CGG AAG GCT ATG AAA GGC TTG GGC ACA  
 GAT GAG GAG AGC ATC CTG ACT CTG TTG ACA TCC  
 CGA AGT AAT GCT CAG CGC CAG GAA ATC TCT GCA  
 GCT TTT AAG ACT CTG TTT GGC AGG GAT CTT CTG  
 GAT GAC CTG AAA TCA GAA CTA ACT GGA AAA ATT  
 GAA AAA TTA ATT GTC GCT CTG ATG AAA CCC TCT  
 CGG CTT TAT GAT GCT TAT GAA CTG AAA CAT GCC  
 TTG AAG GGA GCT GGA ACA AAT GAA AAA GTA CTG  
 ACA GAA ATT ATT GCT TCA AGG ACA CCT GAA GAA  
 CTG AGA GCC ATC AAA CAA GTT TAT GAA GAA GAA

TAT GGC TCA AGC CTG GAA GAT GAC GTG GTG GGG  
 GAC ACT TCA GGG TAC TAC CAG CGG ATG TTG GTG  
 GTT CTC CTT CAG GCT AAC AGA GAC CCT GAT GCT  
 GCA ATT GAT GAA GCT CAA GTT GAA CAA GAT GCT  
 CAG GCT TTA TTT CAG GCT GGA GAA CTT AAA TGG  
 GCG ACA GAT GAA GAA AAG TTT ATC ACC ACT ATC TTT  
 GGA ACA CGA AGT GTG TCT CAT TTG AGA AAG GTG  
 TTT GAC AAG TAC ATG ACT ATA TCA GGA TTT CAA  
 ATT GAG GAA ACC ATT GAC CGC GAG ACT TCT GGC  
 ATT TTA GAG CAA CTA CTC CTT GCT GTT GTG AAA  
 TCT ATT CGA AGT ATA CCT GCC TAC CTT GCA GAG  
 ACC CTC TAT TAT GCT ATG AAG GGA GCT GGG ACA  
 GAT GAT CAT ACC CTC ATC AGA GTC ATG GTT TCC  
 AGG AGT GAG ATT GAT CTG TTT AAC ATC AGG AAG  
 GAG TTT AGG AAG AAT TTT GCC ACC TCT CTT TAT  
 TCC ATG ATT AAG GGA GAT ACA TCT GGG GAC TAT  
 AAG AAA GCT CTT CTG CTG CTC TGT GGA GAA GAT  
 GAC TAA

これまでに報告されている酵母の発現系で用いられたプロモーターとしては、ADH1 (アルコ

ールデヒドロゲナーゼ) プロモーター [ Hetzeman ら、Nature, Vol. 293, p717-722 (1981) ] 、 Pho5 (抑制性酸性フォスファターゼ) プロモーター [ 宮之原ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 80, p1-5 (1983) ] 、 PGK1 (フォスファグルコキナーゼ) プロモーター [ Hitzeman ら、Science, Vol. 219, p620-625 (1983) ] 、 GAP-DH (グリセロアルデハイドフォスフェートデヒドロゲナーゼ) プロモーター [ Bitter ら、Gene, Vol. 32, p264-274 (1983) ] 等が挙げられる。ここに挙げた酵母用プロモーターの中では、特に GAP-DH プロモーターが、プロモーター活性が強く、その結果効率よく外来遺伝子を発現することが知られている。

本発明に係る C P B - I の発現においては、GAP-DH プロモーターを用いた発現系は発現量の面ではかなりよい結果が得られたものの、形質転換体の確代による発現の安定性という一面において問題が残ることが確認された。

そのために、種々のプロモーターとの組み合せ

により、種々のCPB-1発現系を構築し、得られた形質転換体によるCPB-1の発現量と酵代による発現の安定性の両面から検討を進めたところ、前記本発明プラスミドを用いた発現系によりCPB-1を発現させた場合が非常によい結果を示すことが確認された。

すなわち、本発明に係る酵母発現系においては、*Pho5*プロモーターおよびGAP-DHターミネーターを用いることを特徴とし、酵母と大腸菌の遺伝子を有するシャトルベクターが使用される。特に、酵母由来遺伝子として、*2 μ ori*および*ars1*の2つのorigin並びに選択マーカー遺伝子を用いるのが好ましい。

この酵母用選択マーカー遺伝子としては、種々のアミノ酸を産生する遺伝子、例えばロイシン産生遺伝子、ヒステジン産生遺伝子、トリプトファン産生遺伝子等が用いられる。このようなアミノ酸産生選択マーカー遺伝子を用いる場合には、形質転換を行う宿主酵母として、該アミノ酸要求性のものを使用する。

より構築される。両遺伝子の結合は、常法により行われるが、合成リンクー等を使用することにより、端の制限酵素認識部位（制限酵素による切口）が異なる2つのDNA断片を結合させることができとなる。このような合成リンクーは、市販のものを使用することもできるし、目的に応じてDNA合成機により調製することもできる。

このようなCPB-1発現プラスミドを常法により宿主となる酵母宿下に導入することにより、本発明のCPB-1発現形質転換酵母が得られる。代表的な酵母の形質転換方法としては、酵母をプロトプラス化してプラスミドを導入する方法〔Hinnenら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 75, p1929(1978)〕、アルカリ金属による酵母の形質転換方法〔木村ら、J. Bacteriol., Vol. 153, p163(1983)〕等が挙げられる。

宿主酵母の代表例としては、*Saccharomyces cerevisiae* AH22 [*a leu2 his4 Can1*] (微工研第312号) 等が挙げられる。宿主酵母は、発現用プラスミドに用いた酵母選択マーカー遺伝

一方、酵母由来遺伝子としては、大腸菌内でのプラスミドの自体増殖を可能にするoriginおよび大腸菌内で機能する選択マーカー遺伝子が用いられる。この大腸菌用選択マーカーとしては、種々の薬剤耐性遺伝子、例えばアンビシリントリプトファン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、クロラムフェニコール耐性遺伝子等が使用される。このようなoriginと薬剤耐性遺伝子の双方を有する大腸菌由来遺伝子断片として、例えば大腸菌プラスミドpBR322由来の遺伝子断片を使用することが可能である。

このような外來遺伝子発現用シャトルベクターの一例として、第2図に示すシャトルベクターpPS1が挙げられる。このシャトルベクターは*Pho5*プロモーターとGAPターミネーターの間に、外來遺伝子の組み込み部位として、*Ihol*および*BamHI*部位を有する。

本発明のCPB-1発現プラスミドは、このようなシャトルベクターの外來遺伝子用形質発現部にCPB-1-cDNAを組み込むことによ

り構築される。両遺伝子の結合は、常法により行われるが、合成リンクー等を使用することにより、端の制限酵素認識部位（制限酵素による切口）が異なる2つのDNA断片を結合させることができとなる。このような合成リンクーは、市販のものを使用することもできるし、目的に応じてDNA合成機により調製することもできる。

このようなCPB-1発現プラスミドを常法により宿主となる酵母宿下に導入することにより、本発明のCPB-1発現形質転換酵母が得られる。代表的な酵母の形質転換方法としては、酵母をプロトプラス化してプラスミドを導入する方法〔Hinnenら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 75, p1929(1978)〕、アルカリ金属による酵母の形質転換方法〔木村ら、J. Bacteriol., Vol. 153, p163(1983)〕等が挙げられる。

宿主酵母の代表例としては、*Saccharomyces cerevisiae* AH22 [*a leu2 his4 Can1*] (微工研第312号) 等が挙げられる。宿主酵母は、発現用プラスミドに用いた酵母選択マーカー遺伝

子に適したもののが使用される。また、通常の宿主酵母では、*Pho5*プロモーターはリン酸の存在下においてプロモーター活性が抑制されることから、リン酸存在下においても、*Pho5*プロモーター活性を抑制しないよう改良された酵母宿主細胞を使用することも可能である。そのような酵母としては、*Saccharomyces cerevisiae* AH22 pho80 (微工研第309号) が挙げられる。このような改良株を用いれば、リン酸の存在下においても*Pho5*プロモーターは活性が抑制されず、CPB-1を発現させることができる。

通常の酵母宿主、すなわちリン酸存在下においては*Pho5*プロモーターの機能を抑制する酵母を用いた形質転換体では、最初にリン酸を含む培地で酵母を対数増殖期まで増殖した後、これを適度に集団して、次にリン酸を含まない培地中で培養することにより、所望の菌体数まで増殖した酵母に*Pho5*プロモーターを機能させ、CPB-1を一举に発現させることができる。

また、培地としては、酵母の選択マーカーが活

される培地を使用する。例えば、上記の *Saccharomyces cerevisiae* AH22 (*a leu2 his4* strain) を用いた場合には、該宿主酵母菌がロイシジン・ヒスチジン要求株であり、そのいずれかのアミノ酸が組換えプラスミドにより補充される場合には、もう片方の欠損するアミノ酸を含む合成功能を有する。例えばバクルホルダー最小培地 (東江ら、J. Bacteriol., 113, p727-738, P.R. Burkholder, Am. J. Bot., 30, p206 (1943)) が使用される。

単位培地当たりの菌体数を増加させて、CPB-I の発現量を向上させるためには、上記のような選択性合成功能の代わりに、半合成功能と呼ばれる酵母エキスを含む栄養分の高い培地を使用することができる。通常、このような非選択性の培地を用いると菌体数は増加するものの、プラスミドを説明させた酵母菌も増殖し、結果的に発現量は低下することが多いが、本発明の形質転換体では、このような現象は確認されず、非選択性の培地においても選択性培地の場合と同等の発現量を示す。大量培養の際には、段階的な培養により酵母菌

数を増殖させるが、まず数リットルの規模で選択性の培地を用いて培養し、次にこれを栄養豊富な半合成功能により数十～数百リットルの規模で培養することができる。

このようなCPB-I の製造方法によれば、酵母菌体破砕液中に含まれる最も多い蛋白質としてCPB-I を発現させることができ、後の精製においても極めて効率的に目的のCPB-I を精製することができる。

CPB-I の精製方法としては、通常の精製手段を応用することにより、きわめて効率よくCPB-I を精製することができる。

このようにして得られた酵母由来CPB-I のアミノ末端の解析を行ったところ、胎盤から精製されたCPB-I と同様、アミノ末端がアセチル化を受けていることが確認された。このことから、本発明方法により製造されたCPB-I の生理活性が天然のものと比較して何等劣るものではないことが推測される。

本発明は、このような性状的に優れたCPB-I

を、形質転換酵母により極めて大量に発現させることを可能にするものであり、特に工業的レベルでのCPB-I の製造において、きわめて優れた技術を提供するものである。

以下、実施例により本発明を更に詳細に説明す

#### 実施例

##### ① CPB-I 遺伝子の調査

ヒト胎盤 cDNA ライブライアリーより、ファージを用いたクローニングを行い、抗CPB-I マウスモノクローナル抗体を用いて発現蛋白物のスクリーニングを行った。その結果、1.5-6 kbp にわたるほぼ完全長のcDNAを得ることができ、この遺伝子断片には、アミノ酸 319 個からなるCPB-I をコードする遺伝子を含むことが確認された (第1図参照)。CPB-I のcDNAのクローニングに関しては、特開昭64-20095号公报にさらに詳細に記載されている。

##### ② 酵母用シャトルベクター pPSI の調査

外来遺伝子発現用のプロモーターとして酸性フ

ォスファターゼ (Pho5) のプロモーターを有する酵母一大腸菌シャトルベクター pAM82 (特開昭59-36699号) を、制限酵素 *Xba*I および *Pvu*II で処理し、これを 2%アガロースゲル電気泳動に通すことにより、Pho5 プロモーター位を含む約 9.8 kbp の遺伝子断片を得た。

一方、GAP-DH 遺伝子の HindIII 断片 [J. Biol. Chem., Vol. 255, No. 6, p2595-2605 (1980)] を pBR322 の HindIII 部位に組み込んだプラスミド pBR-GAP を、制限酵素 *Sall* および *EcoRV* で処理し、GAP ターミネーターを含む遺伝子断片 (*Sall*-*EcoRV* フラグメント)を得た。この遺伝子断片をクローニングベクター pUC19 の *Sall*-*Sma*I 部位に組み込み、GAP ターミネーターを有するプラスミド pUC-GAPterとした。このプラスミドを制限酵素 *Sai*I で処理して開裂させた後、DNAポリメラーゼ (タレノウフラグメント) により切口をフィルインし、これに *Bam*H リンカーソ導入して再度環状化した。次にこのプラスミドを制限酵素

*Pst*Iで処理し、上記 線にDNAポリメラーゼで反応させた後、*Xba*Iリinkerを導入した。これによりGAPターミネーターのすぐ上流に*Bam*H I部位と*Xba*I部位が導入されたプラスミドpUC-GAPter (*Bam*H I, *Xba*I)を得た。このプラスミドを制限酵素*Rsa*Iで処理し、アガロース電気泳動によりGAPターミネーターを含む約1.4kbの遺伝子断片を得た。これをさらに制限酵素*Iba*Iで処理した後、上記と同様の操作を行い、GAPターミネーターを含む*Rsa*I-IbaIフラグメントを得た。

この遺伝子と上記で調製したpAMB2由来の*Iba*I-PvuIIフラグメントを、T4 DNAリガーゼを用いて結合させることにより、酵母-大腸菌シャトルベクター-pPS1を得た。このシャトルベクターは、外来遺伝子用の発現調節遺伝子としてPho5プロモーターおよびGAPターミネーターを有し、さらに酵母-大腸菌シャトルベクターとして機能するために、酵母由来遺伝子として`ars1`、`2 μori`およびロイシン産生遺伝子

(*Leu2*)を 誘導由来の遺伝子としてアンシン耐性遺伝子およびpBR322のoriginを有する外来遺伝子高発現用ベクターである(第2図参照)。

#### (3) CPB-I 発現プラスミドの構造

上記(1)で得られたCPB-I-cDNAを制限酵素*Nco*Iおよび*Sac*Iで処理し、CPB-Iの全構造遺伝子を含む*Nco*I-SacI断片を得た(第1図参照)。

このCPB-I-cDNA-NcoI-SacI断片を上記シャトルベクター-pPS1の*Iba*I-BamH I部位に組み込むために、第3図に示した2種の異なる合成リinkerを下記の通り作製した。DNA合成機(アプライドバイオシステムズ381A)を用いて下記の4種のDNAを合成した。

DNA1 : TCGAGTAGAGCAAGCAAATTCGAGATTAC  
DNA2 : CATCTCGTTGTTAAAGCTCTAAATGGGTAC  
DNA3 : AAGCTTCTCGAG  
DNA4 : TCGATTCGAAGAGCTCTAG

上記DNA1とDNA2を混合しアニーリング

することにより、第3図にリinker-Aとして示す合成リinkerを得た。このリinkerは、制限酵素*Iba*Iと*Nco*Iで切断された切口の異なる2つのDNA断片を結合させるものであり、リinker全体としての塩基配列は、Pho5プロモーターの機能低下を防ぐべく、本来Pho5プロモーターのリーディング配列のDNA配列と極めて近い配列になるようにデザインされている。

さらにDNA3とDNA4を混合してアニーリングすることにより、第3図にリinker-Bとして示す合成リinkerを得た。この合成リinkerは、制限酵素*Sac*Iと*Bam*H Iで切断された2つのDNA断片を結合せるものであり、その途中のDNA配列には制限酵素*Hind*IIIおよび*Xba*Iの制限酵素認識配列を有する。

CPB-I-cDNA-NcoI-SacI遺伝子断片、合成リinker-A、合成リinker-Bおよびシャトルベクター-pPS1を、制限酵素*Iba*Iおよび*Bam*H Iで処理することにより得られた4種の遺伝子断片を混合し、T4 DNAリガーゼにて反応さ

せた。

この反応液を、フェノール処理、エタノール沈殿させたのち、これを用いて大腸菌HB101コンピント細胞の形質転換を行った。得られた形質転換クローンのプラスミドDNAを回収し、適当な制限酵素で処理して、アガロースゲル電気泳動からの切断パターンを分析することにより、シャトルベクター-pPS1の*Iba*I、*Bam*H I部位にCPB-I-cDNA-NcoI-SacI断片が組み込まれた所要のCPB-I 発現プラスミドpAPCPB-I(第4図参照)を持つ大腸菌クローンを得た。このクローンから常法に従いプラスミドpAPCPB-Iを調製した。

#### (4) CPB-I を発現する形質転換酵母の調製

宿主酵母としてサッカロマイセス・セレビシエAH22 Pho80(微工研条寄第508号)を用い、これをYPD培地(2%ボリペプトン、1%イーストエキス、2%グルコース)100mLに接種し、30℃で5-7×10<sup>6</sup>まで培養した後、遠心して集菌し洗浄した後、1mLのリチウム溶液に懸濁

した。30℃で1時間振とう。その10分の1量( $100 \mu\text{l}$ )に約2mgの組換えDNA(プラスミドpAPCPB-I)を加えて30℃で30分間培養とした。これに0.7mlのポリエチレングリコール溶液を加え、30℃で90分間静置した。37℃で5分間熱処理後、滅菌水で2回洗浄した。この培養液の最小培地( $0.7\%$ イーストロゲンペーパー、 $2\%$ アミノ酸、 $2\%$ グルコース、 $2.0 \text{ mg}/\text{ml}$ ヒスチジン、 $2\%$ 寒天)に細胞を懸濁させ同最小培地プロテクトに塗布した。30℃で培養してロイシン非要求性のコロニーを得た。このコロニーを $2.0 \mu\text{l}$ の PBS-Tween20( PBS +  $0.5 \text{ ml}$ 溶解する)にて培養し、形質転換酵母サッカロマイセス・レシピシエpAPCPB-Iを得た。

#### ④酵母によるCPB-Iの発現

記形質転換酵母を30℃で3日間振とう培養後、遠心( $3500 \text{ rpm}$ 、5分間)により酵母菌体を集めた後、 $1/10$ 培養液量の溶媒液( $25\text{mM}$  DTT- $25\text{mM}$ トリス塩酸緩衝液(pH9.4))に懸濁し、ラスピーズを加えミキシングすることにより酵母細胞を壊した。

破碎した後、OPD溶液を酵素基質溶液として $10 \mu\text{l}$ ずつ添加する。暗所にて $25^\circ\text{C}$ 30分間反応させた後、 $4.5\text{M H}_2\text{SO}_4$ を $50 \mu\text{l}$ ずつ添加し、キサーで混合して反応を停止させる。これを $9.2 \text{ nm}$ の吸光度を測定し、CPB-I標準品の吸光度から検量線を求め、各検体のCPB-I量を定量する。

その結果、1%の酵母培養液から約 $150 \text{ ng}$ のCPB-Iが得られていることが確認された。また、この結果と酵母破碎液中の酵可溶化蛋白質を測定した結果とから、本発明においては酵可溶化蛋白質のうち約40%もの割合でCPB-Iを得ることが可能であることが判明した。

次に、この酵母破碎液をSDS-ボリアクリルアミドゲル電気泳動により解析した。すなわち、 $1.0\%$ ボリアクリルアミドゲルにより検体を電気泳動し、これをコマージーブリリアントブルー(CBB)にて染色した。その結果、他の酵母由来の蛋白質のバンドと比較して、きわめて大量であることを示すCPB-I(分子量約34,000)の

母國に物理的衝撃によって酵母菌を破壊した。これを遠心して、グラスビーズおよび酵母破碎片を除去し、遠心上清を得た。

この上清について、抗CPB-Iモノクローナル抗体を用いたELISAによりCPB-Iの活性を測定した。このELISAは、下記の操作からなる。

まず、ポリスチレン製96穴ELISA用マイクロプレートに、一次抗体として抗CPB-Iマウスモノクローナル抗体をコーティング用緩衝液([0.05M炭酸ナトリウム緩衝液(pH9.6)])で $1.0 \text{ \mug}/\text{ml}$ に希釈し、各ウェルに $100 \mu\text{l}$ ずつ注入する。 $25^\circ\text{C}$ で2時間静置し、PBS-Tween(PBS 1Lに対してTween20を $0.5 \text{ ml}$ 溶解する)で洗浄した後、各ウェルにCPB-I標準液および検体を $100 \mu\text{l}$ ずつ注入し、 $25^\circ\text{C}$ 一夜反応させる。その後PBS-Tweenにて洗浄した後、西洋ワサビ・バーオキシダーゼ標識Fab'抗CPB-I抗体をPBS-Tweenで希釈して各ウェルに $100 \mu\text{l}$ ずつ注入し、 $25^\circ\text{C}$ 2時間以上反応させる。3回

バンドが確認された。その結果の模式図を第5図に示す。

#### ⑤工業的規模の大規模培養によるCPB-Iの生産

前記(4)で得られた形質転換酵母を、最小培地にて $30^\circ\text{C}$ 、 $2\%$ のスケールで培養した。次いでこれを $30\text{L}$ の最小培地に接種し、 $30^\circ\text{C} 7\text{ h}$ 時間培養した。これを $170\text{L}$ の半培養地(培地1L中にショ糖4.0g、酵母エキス5g、硫酸アンモニウム5g、硫酸マグネシウム・7水和物0.5g、消泡剤としてボリオキシケチレンボリオキシブロビレスチル $0.025\text{ ml}$ )にて $30^\circ\text{C}$ 、 $24$ 時間培養した。最終培養後の酵母細胞に存在するCPB-Iの量を前記ELISAにて測定したところ、選択能力のない半培養地においても、選択培養地(最小培地)での発現量と同等のCPB-Iの存在を確認した。

このことは、本形質転換株が離代培養においてもきわめて発現の安定性がよいことを示している。

さらに、発現量についても前記(4)の小スケールでの発現実験において得られた発現量と同等のレ

ベルで C P B - I の発現が維持されていることが確認された。

### (7) C P B - I の大量精製

上記で大量培養した培養菌液より  $0.1 \mu\text{m}$  のメンブランフィルターを用いて粗抽出酵母液を簡便に、フランチプレス型細胞破砕機により物理的刺激を加えて酵母細胞を破壊した。その後、過濾を行い、得られた粗抽出液を限外漉過器により濃縮した。これに酢酸を加えて等電点沈殿液(pH4.5)を行った後、生成した沈殿物を遠心により除去し、上清をアンモニアにより pH を 7.0 に調整し、次いで Q A E - トヨバル 550 C (トーソー社製) を用いる陰イオン交換クロマトグラフィーに供した。すなわち、 $7.0 \text{ mM}$  塩化ナトリウムを含む  $1.0 \text{ mM}$  リン酸緩衝液 (pH7.4) で平衡化したカラムに粗抽出液をアプライし、同様緩衝液で洗浄後、 $3.0 \text{ mM}$  塩化ナトリウムを含む  $1.0 \text{ mM}$  リン酸緩衝液 (pH7.4) で溶出した。得られた C P B - I を含む画分を限外漉過器により濃縮した後、 $1.0 \text{ mM}$  塩化ナトリウムを含む  $1.0 \text{ mM}$  リン酸緩衝液 (pH7.4) で平衡化し

$3.0 \text{ g}$  オングストローム (直径  $1.0 \text{ mm} \times$  長さ  $250 \text{ mm}$ , 半井化学社製) を用い、溶媒液として 0.1% トリフルオロ酢酸溶液及び 0.1% トリフルオロ酢酸を含む 8.0% アセトニトリル溶液を用いて直線濃度勾配により流速  $1 \text{ mL}/\text{min}$  で溶出した。

検出は  $214 \text{ nm}$  の紫外吸収により行った。得られた各ペプチドについてビコダグアミノ酸分析装置 (ミリポアリミテッド社製) によりアミノ酸組成分析を行い、N末端ペプチドを含む画分を同定した。この N 末端ペプチドは、アルギニンとグルタミン酸、アラニン、バリン、ロイシンの 5 個のアミノ酸から構成されていることを確認した。

次いでアミノ酸配列解析を行った結果、N 末端アミノ基はブロックされていた。更に、FAB-MASS 分析装置 (日本電子社製 JMS-0300) により分析した結果、分子量は 627 であった。

以上の結果から N 末端はアセチル化されており、以下の配列を有すると判断した。

Acetyl-Ala-Gln-Val-Leu-Arg

### (8) 胎盤抽出 C P B - I との抗血液凝固活性の比

た TSKG3000 カラム (トーソー社製) によりゲル通過を行った。その後 C P B - I を含む画分を、再度  $7.0 \text{ mM}$  塩化ナトリウムを含む  $1.0 \text{ mM}$  リン酸緩衝液 (pH7.4) で平衡化した Q A E - トヨバル 550 C にアプライし、洗浄後、 $7.0 \text{ mM}$  より  $3.0 \text{ mM}$  までの塩化ナトリウムの直線濃度勾配で溶出し、精製 C P B - I を得た。

### (9) 酵母により産生された C P B - I の物性

#### (A) N 末端アミノ酸配列分析:

酵母由来 C P B - I  $5.6 \text{ mg}$  を、 $6 \text{ M}$  グアニジンを含む  $0.2 \text{ M}$  トリス塩酸緩衝液 (pH8.2) に溶解し、ジチオスレイトール  $5 \text{ mg}$  を加え、室温で 30 分間反応させた後、ヨード酢酸  $5.0 \text{ mg}$  を加え室温で 30 分間反応させて S - カルボキシメチル C P B - I を得た。

これを  $2 \text{ M}$  尿素を含む  $2.0 \text{ mM}$  トリス塩酸緩衝液 (pH7.4) に溶解し、トリプシン  $1.0 \text{ mg}$  を加えて 37°C、24 時間消化させた後、逆相クロマトグラフィーによりペプチドの分離を行った。

クロマトカラムとしてコスモシリル 5 C<sub>18</sub>

### 較

本発明酵母由来 C P B - I とヒト胎盤由来 C P B - I の抗血液凝固活性を比較した。すなわち、 $0.5 \text{ mg}/\text{mL}$  の PT 試薬 (リオプラスチン、持田製薬社製)  $1.0 \text{ mL}$  および各種濃度の試料  $1.0 \text{ mL}$  を混和し、3 分後に生理食塩水で 2 倍に希釈した標準液  $2.0 \text{ mL}$  を添加し血液凝固時間を測定した。

酵母由来 C P B - I とヒト胎盤由来 C P B - I の抗血液凝固作用を比較した表 1 から判るよう、本発明酵母由来 C P B - I とヒト胎盤由来 C P B - I とは、ほぼ同じ血液凝固時間 (PT) の延長効果を示した。

以下余白

卷一

添加試料 (A群/反応液)	血液凝固時間(秒)	
	酵母由来 CPB-I	ヒト胎盤由来 CPB-II
0	28	29
1	88	79
2	125	119
5	170	165
7	191	192

### 四面の簡単な説明

第1図は、先に出版よりクローニングされたS-PB-1-cDNAの全塩基配列を示す図である。翻訳開始コドンATGのAを1番目として番号を付した。

第2図は、本発明に用いたシャトルベクターPSIの構造を示す図である。

第3図は、プラスミドpAPCPB-Iの構造の際に使用した合成リンカーの構造を示す図である。

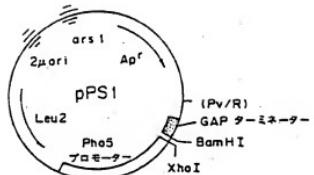
第4図は、本発明のCPB-I発現プラスミドAPCPB-Iの構造を示す図である。

第5図は、本発明の形質転換体によるCPB-

Iの発現を示す、波破滅のポリアクリルアミドゲル電気泳動のパターンを示す模式図である。レーン1は分子量マーカーで、上から20.0K、9.7K、6.8K、4.3K、2.9K、18.4K、14.3Kダルトンを示す。レーン2～4は、本発明のCPB-I産生菌質粒体破滅液の泳動パターンである。レーン5は、本発明のプラスミドを有さない宿主酵母菌の破滅液の泳動パターンである。(添付図)

目上

第四圖



三 4

リンク - A

XbaI            Phe5 Leader

~~800~~ Phos Leader

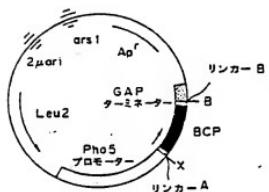
リンカーン

1961

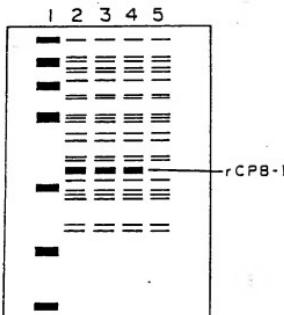
AAGCTTCTCGAG  
TCGATTGAAAGAGCTCCTAG

### SacI HindIII BamHI

第 3 四



第 5 図



次1頁の続き

@Int. Cl.	識別記号	庁内整理番号
C 12 N	1/19 15/81	9050-4B
C 12 P	21/02	ZNA C 8214-4B
(C 12 N	1/19	
C 12 R	1:865)	
(C 12 N	15/81	8515-4B
C 12 R	1:645	
	1:19)	
(C 12 P	21/02	
C 12 R	1:865)	

発明者 岩崎 昭夫 千葉県松戸市常盤平1-14-1 長谷川レジデンス302号  
発明者 須田 誠 東京都東村山市野口町2-17-43 興和東村山荘206号

手稿補正書(自発)

## 6. 補正の対象

### 明細書の「発明の詳細な説明」の欄

平成2年12月4日

## 7. 補正の内容

明細書中、第7頁、第2行

特許廳長官 楊 坤 敬 聲

## 1. 事件の表示

卷之二

• 第四章：如何有效管理时间

CD-ROMの製造方法とされたものが、今後も

卷之三

#### 4. 標正をする者

事件との関係

名 师 财团法人 化学及应用科学研究所

新編 藥理書 卷之二

代量人

住 所 東京都中央区日本橋人形町1丁目3番6号(1103)

共同ビル 電話(669)0904 (13)

(6870) 弗瑞士 有實三等

上回

(7756) 奈理士 高野 登志雄

卷之三

(9673) 弗理士 中 島 俊 夫

の日付

*—*

—  
—

—  
—